



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 44 38 087 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
G 01 N 27/333
C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/26

④
DE 44 38 087 A 1

⑳ Aktenzeichen: P 44 38 087.9
㉔ Anmeldetag: 25. 10. 94
㉕ Offenlegungstag: 2. 5. 96

㉚ Anmelder:
Scheller, Frieder, Prof. Dr., 16341 Zepernick, DE

㉚ Erfinder:
Scheller, Frieder, Prof. Dr., 16341 Zepernick, DE;
Bier, Frank, Dr., 16321 Schönow, DE

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab

⑤④ Sensoranordnung mit amperometrischer oder potentiometrischer H_2O_2 -anzeigender Elektrode zur Bestimmung von Superoxid O_2^-

⑤⑦ Die Erfindung betrifft eine Sensoranordnung mit amperometrischer oder potentiometrischer H_2O_2 -anzeigender Elektrode zur Bestimmung von Superoxid O_2^- . Anwendung findet die Sensoranordnung zur Bestimmung und zum Nachweis von lebenden Zellen und Biomakromolekülen, wie Proteine, Viren oder Bakterien.

Die erfindungsgemäße Sensoranordnung ist gekennzeichnet durch

- ein O_2^- -produzierendes Objekt oder eine O_2^- -haltige Meßlösung in direktem Kontakt mit einer
- gaspermeablen Membran und
- einer mit einer superoxiddismutierenden Substanz beschichteten H_2O_2 -anzeigenden Elektrode.

DE 44 38 087 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Sensoranordnung mit amperometrischer oder potentiometrischer H_2O_2 -anzeigender Elektrode zur Bestimmung von Superoxid O_2^- . Anwendung findet die Sensoranordnung zur Bestimmung und zum Nachweis von lebenden Zellen und Biomakromolekülen, wie Proteine, Viren oder Bakterien.

O_2^- ist ein kurzlebiges Radikal mit einer Halbwertszeit bei pH 7 von wenigen ms. Deshalb ist eine direkte Anzeige sehr kompliziert, z. B. kann der Spin des ungepaarten Elektrons mit der Elektronenspinresonanz und damit auch die O_2^- -Konzentration erfaßt werden. Hierzu ist aber eine "Schockgefrierung" der Meßprobe erforderlich, um den Zerfall des O_2^- zu verlangsamen. Der chemische O_2^- -Nachweis benutzt die Reaktion von O_2^- mit Cytochrom c, Sulfit oder Nitroblau-Tetrazolium (McCord et al, Superoxide Dismutase Assays: A Review of Methodology in: Superoxide and Superoxide Dismutases. Ed.: Michaelson, Academic Press, London, 1977).

Allerdings ist dieses Verfahren unspezifisch, da auch andere reduzierende Substanzen zu dieser Farbbildung führen können. Es ist ein weiterer Sensor zur Bestimmung von O_2^- bekannt, bei dem die Reduktion des Ferri-Cytochrom durch O_2^- elektrochemisch angezeigt wird (McNeil et al, Free rad. Res. Comm., 17, 6, 399—406, 1992; Cooper et al, J. Electroanal. Chem., 347, 267—275, 1993). Für die Messung ist es erforderlich, das Cytochrom c an platiniierten Kohleelektroden zu adsorbieren oder es über SH-Spacer kovalent an eine Gold-elektrode zu fixieren. Das Meßsignal wird durch die Oxidation des durch O_2^- reduzierten Cytochrom c erzeugt, wozu ein Potential von + 100 mV v.s. S.C.E. angelegt werden muß. Bei diesem Potential werden aber andere Substanzen an der Elektrode oxidiert, z. B. Ascorbinsäure und SH-haltige Peptide, wie Glutathion.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Sensoranordnung bereitzustellen, die Störeffekte durch Probenbestandteile an der Elektrode völlig ausschließt.

Die Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche 2 bis 8 sind Vorzugsvarianten.

Erfindungsgemäß wird für die Sensoranordnung eine gaspermeable Membran zur Abdeckung der Indikatorlösung gegenüber der Meßlösung eingesetzt, wobei überraschenderweise das Superoxid durch diese Membran permeiert. Dadurch wird es möglich, daß vor die Elektrode gelangte O_2^- mittels des Enzyms Superoxid-dismutase in H_2O_2 und O_2 zu zerlegen, wobei das entstehende H_2O_2 bei dem angelegten Potential oxidiert wird, wobei der Strom der ursprünglichen O_2^- -Konzentration vor der Membran proportional ist.

Die kurze Lebensdauer des O_2^- führt dazu, daß im Innern der Meßlösung entstandenes O_2^- nur zu einem kleinen Signal führt, während die gleiche Menge in der Nähe der Deckmembran einen erheblich höheren Strom liefert. Dieses Verhalten ist für die Trennung der Signale von Lösung und Membranoberfläche, wie sie bei trennungsfreien Immunoassays erforderlich ist, eine gewünschte Eigenschaft. Deshalb wird die erfindungsgemäße Sensoranordnung für solche "pseudohomogenen" Immunoassays eingesetzt, wobei das O_2^- durch ein Markerenzym erzeugt wird. Durch die kurze Lebensdauer des Superoxids wird nur ein Teil des Markerenzym erfaßt, der an Immunkomponenten auf der Deckmembran fixiert wird. Dagegen liefern die im Innern der Meßlösung befindlichen Markerenzyme kein Meßsignal. Daüber hinaus hat die erfindungsgemäße Sensor-

anordnung gegenüber den bisher beschriebenen "pseudohomogenen" Immunoassays den Vorteil, daß die Zugabe eines Scavanger-Enzyms, wie z. B. Katalase, in die Lösung, um die in der Lösung gebildeten Reaktionsprodukte zu zerstören, nicht erforderlich ist.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die Benutzung einer gaspermeablen Membran als Abdeckung der Indikatorelektrode gegenüber der Meßlösung zum vollständigen Ausschalten von Störeffekten an der Elektrode durch Probenbestandteile führt. So ruft die Gegenwart von H_2O_2 oder Ascorbinsäure an der membranbedeckten Indikatorelektrode kein Störsignal hervor.

Die erfindungsgemäße Sensoranordnung kann vorzugsweise zur Bestimmung und zum Nachweis von Proteinen, Zellen oder Zellbestandteilen, Viren und Bakterien eingesetzt werden.

Bei Miniaturisierung kann die Sensoranordnung als O_2^- -Sonde zur Lokalisierung von O_2^- -Quellen, z. B. im Organismus oder in der Zelle direkt eingesetzt werden.

Anschließend wird die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erläutert, die sie jedoch nicht begrenzen sollen.

Beispiel 1

Bestimmung des Schilddrüsenhormons TSH (Thyroid stimulating hormone) im Blut.

Es wird ein Sandwich-Immunoassay im pseudohomogenen Format (nur Zugabe des Analyten) eingesetzt, wobei als O_2^- -produzierendes Markerenzym Xanthinoxidase (XOD) mit dem 2. Antikörper konjugiert wird. Die Elektrode wird mit einem Fängerantikörper (1. Antikörper) beschichtet, der Nachweis-Antikörper (tracer, 2. Antikörper) befindet sich in Form des Konjugates mit der Xanthinoxidase in der Lösung, die Xanthin oder Hypoxanthin als Substrat der XOD bereits im Überschuß enthält. Bei Einführen der Blutprobe, die TSH enthält, in die Meßlösung wird durch Vermittlung der Blutprobe das Konjugat und damit der Marker in unmittelbare Nähe zur Elektrodenoberfläche gebracht und damit das Signal für O_2^- stark erhöht. Die Erhöhung entspricht dem Gehalt an TSH in der untersuchten Probe.

Nach dieser Methode können alle Analyte, die einen Sandwich-Immunoassay zulassen, wie Proteinen, Zellbestandteile, Viren oder Bakterien bestimmt werden.

Beispiel 2

Detektion des Pestizides 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) mittels Verdrängungsassay.

Der vor der Sensoranordnung immobilisierte Antikörper gegen 2,4-D wird mit einem 2,4-D-Xanthinoxidase-Konjugat (oder einem entsprechenden O_2^- -produzierenden Enzym, das mit 2,4-D gekoppelt wurde) beladen. In Abwesenheit von 2,4-D wird das an der Sensoranordnungs-Oberfläche produzierte O_2^- nachgewiesen. Bei Zugabe von 2,4-D wird das Konjugat entsprechend der Konzentration abgelöst (verdrängt) und das Signal fällt.

Nach dieser Methode können auch andere Haptene, kleine Moleküle, die nicht selbst immunogen wirken und in der Regel nicht von 2 Antikörpern gleichzeitig gebunden werden können, nachgewiesen werden. Die zusätzliche Zugabe eines Analyt-Enzym-Konjugates zur Meßlösung vor der Inkubation mit der Antikörper-beschichteten Elektrode führt in analoger Weise zum kompetiti-

ven Assayformat. Der Vorteil des waschfreien Immunassays bleibt ebenfalls erhalten, da zum Analyten nur ein Nachweisreagenz (Analyt-Xanthinoxidase Konjugat) zugegeben werden muß.

Patentansprüche

1. Sensoranordnung (SAO) mit amperometrischer oder potentiometrischer H_2O_2 -anzeigender Elektrode zur Bestimmung von Superoxid $O_2^{\cdot-}$, gekennzeichnet durch

- ein $O_2^{\cdot-}$ -produzierendes Objekt oder eine $O_2^{\cdot-}$ -haltige Meßlösung in direktem Kontakt mit einer
- gaspermeablen Membran und
- einer mit einer superoxiddismutierenden Substanz beschichteten H_2O_2 -anzeigenden Elektrode.

2. SAO nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß $O_2^{\cdot-}$ -produzierende Objekte lebende Zellen und Biomakromoleküle sind.

3. SAO nach Anspruch 1 und 2 gekennzeichnet dadurch, daß es sich um Lymphozyten, Makrophagen, Leukozyten, Epithelzellen, das Enzym Xanthinoxidase, Lipoxigenase oder NADH-Oxidase oder mit Xanthinoxidase, Lipoxigenase oder NADH-Oxidase konjugierte Antikörper oder Antigene handelt.

4. SAO nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß als gaspermeable Membran eine Polypropylen- oder Polytetrafluorethylenmembran mit einer Dicke von 5 bis 40 μm eingesetzt wird.

5. SAO nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß die Elektrode aus Kohle oder Platin besteht.

6. SAO nach Anspruch 1 und 5 gekennzeichnet dadurch, daß die Kohle- oder Platinelektrode auf +100 bis +900 mV polarisiert ist.

7. SAO nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß die superoxiddismutierende Substanz Superoxiddismutase oder ein niedermolekularer superoxiddismutatisch aktiver Metallkomplex ist.

8. SAO nach Anspruch 1 und 7 gekennzeichnet dadurch, daß die Schichtdicke der immobilisierten superoxiddismutatisch aktiven Schicht 0,5—50 μm beträgt.

- Leerseite -